

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 58-193446

(43)Date of publication of application : 11.11.1983

(51)Int.CI.

G01N 27/26

B01D 57/02

(21)Application number : 57-075270 (71)Applicant : HITACHI LTD

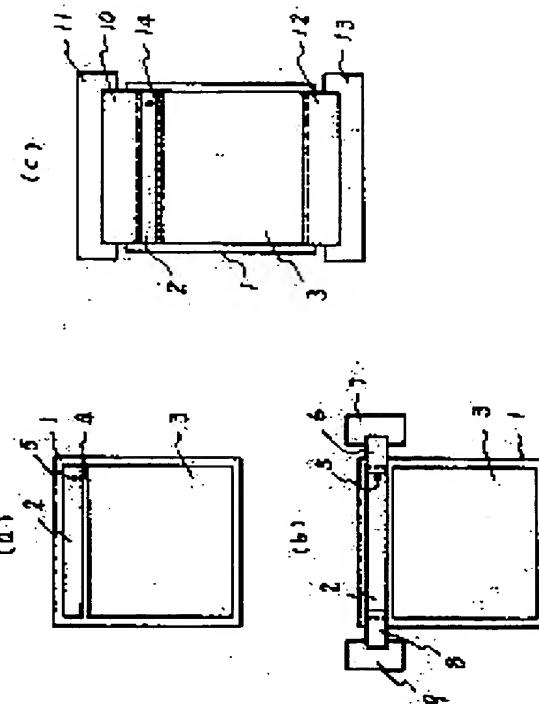
(22)Date of filing : 07.05.1982 (72)Inventor : YOSHIDA MOTOKO
ITO MICHIO

(54) SIMPLE TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS

(57)Abstract:

PURPOSE: To greatly simplify the operation of electrophoresis separation by a method wherein supports used for one- and two-dimensional electrophoresis separations are coupled in adjacent relation to each other on a base of high mechanical strength, and this single base is utilized to perform the two-dimensional electrophoresis separation.

CONSTITUTION: Supports 2, 3 used for one- and two-dimensional electrophoresis separations are coupled in adjacent relation to each other on a base 1 of high mechanical strength. The base 1 is activated at its surface by alkali processing and undergoes the surface processing with a silane coupling agent. An acrylamide gel with grade in density is fixedly attached onto the base, and gels of uniform density for one-dimensional electrophoresis are similarly



B2

fixedly attached onto the end of the lowest density in the base with constant intervals. At the time when the one-dimensional electrophoresis separation has been completed, a binder mainly composed of agar and impregnated with an electrolyte such as a buffer solution is filled into each groove between two kinds of gels, thereby to unitize them and premit two-dimensional development.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁 (JP)
⑩ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開
昭58—193446

⑫ Int. Cl.³
G 01 N 27/26
B 01 D 57/02

識別記号
厅内整理番号
7363—2G
7404—4D

⑬ 公開 昭和58年(1983)11月11日
発明の数 1
審査請求 未請求

(全 3 頁)

⑭ 簡易 2 次元電気泳動法

⑮ 特 願 昭57—75270

⑯ 出 願 昭57(1982)5月7日

⑰ 発明者 吉田基子
国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番
地株式会社日立製作所中央研究
所内

⑱ 発明者 伊藤迪夫

国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番
地株式会社日立製作所中央研究
所内

⑲ 出願人 株式会社日立製作所
東京都千代田区丸の内1丁目5
番1号

⑳ 代理人 弁理士 薄田利幸

明細書

発明の名称 簡易 2 次元電気泳動法

特許請求の範囲

1. 同一基板上に2種類の電気泳動用支持体を一定間隔を置いて固定化し、1次元電気泳動終了後、両者の間際に電解液を含有するバインダーを充填することによつて2種の支持体を一体化し、2次元目の泳動を行なうことを特徴とする2次元電気泳動法。

発明の詳細な説明

本発明は、臨床検査を目的とした血液などの体液の分析法にかかわり、特に、体液中に含まれる諸種蛋白質の多成分同時分析に好適な2次元電気泳動分析法に関するものである。

従来、血液蛋白質の多成分同時分析法として用いられているポリアクリルアミドゲルを支持体とする2次元電気泳動法（詳細は例えば「蛋白質・核酸・酵素」、共立出版、1978年9月号211頁参照）においては、まず、1次元目の泳動はガラス管内に充填されたポリアクリルアミドを、ま

た2次元目はガラス板あるいはアクリル板とスペーサーから構成される容器内にアクリルアミドの濃度勾配を形成させたのち直合させた平板ゲルを支持体として用いている。1次元目のゲルにはあらかじめ多種類のポリアミノカルボン酸あるいはポリアミノスルフォン酸等から成る両性扭体（たとえばLKB社製アンフォライン、Bio Rad製バイオライト等）が含まれており、陽極（酸性液）、陰極（アルカリ液）両極間に電圧をかけ泳動が進むにしたがつてゲル内にpH勾配が形成される。

ゲル上に充填した試料蛋白は泳動過程で個別の等電点位置に分離濃縮されてくる。定常状態になつた時点でこのゲルをガラス管から押し出し2次元用平板ゲルの上部に水平にのせ、緩衝液（たとえばトリスーグリシン pH 8.6）を滴した両極間に電場をかけ、1次元で分離した成分をさらに分子量差により分離を行なう。泳動終了後容器を解体して平板ゲルを取り出し、蛋白染色液に浸漬、放置後バックグラウンドの脱染を行ない、残存している染色蛋白質スポットの吸光度を測定する。

しかしながら、1次元目に用いる細長いゲルは柔らかく、ガラス管から押し出し平板ゲルの一端にすきまなく密着させる操作を機械的で行なうことは困難である。また、2次元泳動後の柔らかい平板ゲルを容器から取り出し、染色、脱染、吸光度測定など一連の操作をすると、ゲルの破損などの問題が生ずる。

本発明の目的は、上記従来法の欠点を改良した操作性の良い簡単な2次元電気泳動法を提供することにある。

本発明は1次元目と2次元目の泳動分離に用いる支持体を機械的強度の高い基板の上に接着して結合させ、この基板1枚で2次元泳動分離を行なうものである。支持体を固定する基板（たとえばガラス、ポリエチレンなど）は表面を清潔に保つたのちアルカリ処理（たとえば6NNaOH溶液中に浸漬、水洗、乾燥）で表面を活性化しておき、これにシランカプリング剤で表面処理を施す。ここで用いるシランカプリング剤($RSiX_3$)、Rはたとえばビニル基、メルカブトプロピル基、

電気泳動効果に影響を及ぼさないものなどである。例えば、アガロース、ガラスなどを用いることができる。

以下、本発明を実施例を用いて説明する。

実施例1

第1図を用いて実施例を説明する。ガラス板1の片面をメタアクリルオキシプロピルトリメトキシシランで処理し、ガラス板上10cm四方にアクリルアミドの濃度勾配4～20%を有し、かつ、 $0.05M$ (mol/L)のトリスヒドロガシメチルアミノメタンおよび0.38Mのグリシン水溶液(以下A液と云う)を含むポリアクリルアミドゲル3($50 \times 50 \times 2mm$)を結合する。次に、このガラス板上にさらにポリアクリルアミド濃度4%を含みかつ2%の両性電解質、アンフォライン(スウェーデン、LKB社製、pH3.5～9.5)を含むゲル2($50 \times 8 \times 2mm$)を2mmの間隔4を隔てて濃度勾配ゲルの低濃度(4%)端に作成する。(以上第1図(a))。次に試料である血清8μlを5の試料孔に注入し、ゲルの両端はそれぞれ

特開昭58-193446(2)

メタクリルオキシプロピル基、グリシドオキシプロピル基などの有機残基、Xはエトキシ、メトキシ、アセトキシなどに代表される有機残基から成る化合物で、基板上の水酸基とX基の間で脱水結合が起り、他方Rとアクリルアミド不飽和二重結合との間で結合が起ることによりアクリルアミドを基板に固定化せるものである。

本発明は、この基板上に濃度勾配アクリルアミドゲルを結合固定させ、さらにこの低濃度端に一定の間隔を置いて1次元泳動用の均一濃度のゲルを同じく結合固定させておき、1次元目の電気泳動分離が終了した時点で上記2種類のゲル間の溝にアガロース(寒天)を主体とし、これに緩衝液等の電解質を含浸させたペインダーを充填することにより両者を一体化し、2次元展開を可能にしたものである。

上記ペインダー材料に要求される条件は、(1)蛋白質等の試料を吸着捕獲しないもの、(2)目づまりなどして蛋白質の移動を妨げないもの、(3)アクリルアミドゲルとの密着性がよいもの、(4)帯電して

0.04MNaOH水溶液(陰極槽7)、0.01MH₂PO₄水溶液(陽極槽9)に汎紙6、8を介して液絡したのち、通電し、血清蛋白質をその等電点差により分離する。(以上、第1図(b))。1次元電気泳動終了後直ちにこの液絡用汎紙を取り除き、それと同時に2種類のゲルの間隙に泳動用アガロース粉末の加圧成型体14(たとえば0.1gのアガロースを $1.5 \times 5.0mm$ のダイスにつめ、 $21/cm^2$ で加圧成型したもの)を挿入し、A液を含浸させる。次にA液を含浸した液絡用汎紙10をゲル2に接触させて置き、これを負電極槽11に接続する。同様にA液を含浸させた液絡用汎紙12を濃度勾配用ゲル3の高濃度端に置き、これを正電極槽13に接続し、両電極間に通電して成分蛋白質をその分子量差に基づいてゲル3の内部に分離する。(以上、第1図(c))。なお泳動分離の過程でガラス基板1は水平位置に保持しておく。

実施例2

構成は実施例1と同様であるが、1次元泳動用

支持体としてアガロースゲルを用い、2種類のゲルの間隔の充填剤としてもアガロースゲルを用いるものである。1次元泳動用支持体はアガロース粉末（例えばマリンコロイド社、Seaplaque）1%を含みかつ2%の両性電解質アンフォラインを含む浴液をゲル化したものを用いる。作成に当つては表面処理を施したガラスまたはポリエチレンからなる基板（60×70×1.5mm）上にまずアクリルアミド4～20%の濃度勾配平板ゲル（50×50×1mm）を結合させ、この低濃度側に1.5mmの間隔を置いて帯状に等電点泳動用アガロースゲル（10×50×1mm）を結合させる。実施例1と同様の方法で1次元泳動終了後直ちに2種類のゲルの間隔4にアガロース浴解液（1%低融点アガロースーたとえばマリンコロイド社製Seaplaque、0.05Mトリスヒドロキシメチルアミノメタンおよび0.38Mグリシン水溶液）を流し込み、充分ゲル化するのを待つて冷却を充分に行ないながら2次元目の泳動分離に切りかえる。

以上本発明によれば、1次元目と2次元目の2

特開昭58-193446(3)

つの機械的強度の低いゲル状支持体を直接取扱う必要がなくなり、固い基板ごとゲルを取扱えるため泳動分離操作は大巾に簡略化され、得られる2次元電気泳動像は分離能、再現性共従来法に比し同等あるいはそれ以上である。

図面の簡単な説明

第1図a, b, cは本発明の方法を実施するための泳動装置の平面図である。
1…基板、2…1次元目の泳動用支持体、3…2次元目の泳動用支持体、4…隙間、5…分析試料添加用スペース、6…液路、7…負電極槽、8…液路、9…正電極槽、10…液路、11…負電極槽、12…液路、13…正電極槽、14…間隙充填用アガロース。

代理人弁理士 薄田利幸

